

**Untersuchungen über die Eignung
vom komplementbindenden
Rhinopneumonitisvirus-Antigen
aus Zellkulturen und über die
Antikörperbildung in Mäusen und
Goldhamstern nach einer Impfung
mit attenuiertem Rhinopneumonitisvirus**

Aloysius Mubiru

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG VOM KOMPLEMENTBINDENDEN
RHINOPNEUMONITISVIRUS-ANTIGEN AUS ZELLKULTUREN UND
ÜBER DIE ANTIKÖRPERBILDUNG IN MÄUSEN UND GOLDHAMSTERN
NACH EINER IMPFUNG MIT ATTENUIERTEM RHINOPNEUMONITISVIRUS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Aloysius Mubiru

aus Villa-Maria/Masaka, Uganda

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. E. Vollmerhaus
Referent: Priv. Doz. Dr. H. Mahnel
Korreferent: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Tag der Promotion: 5. 2. 1971



DEM JUSTINUSWERK
IN DANKBARKEIT GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	4
B. SCHRIFTTUM	6
I. Antigener Aufbau des Rhinopneumonitisvirus des Pferdes	6
1. Das immunisierende Prinzip	6
2. Komplementbindende Antigene	8
3. Präzipitierendes Antigen	9
4. Hämagglutinin	10
5. Das Normalkomponenten-Antigen	11
II. Serologische Reaktionen bei der Rhinopneumonitis- Infektion des Pferdes	11
1. Virusneutralisationstest	11
2. Komplementbindungsreaktion	13
3. Hämagglutinationshemmungsreaktion	14
4. Präzipitation im Agargel	15
5. Fluoreszenzserologische Reaktion	16
III. Antikörperbildung bei der Rhinopneumonitis- Infektion	16
1. Allgemeines	17
2. Antikörperbildung bei der Abortform	17
3. Antikörperbildung bei der respiratorischen Verlaufsform	20
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	21
I. Material und Methoden	21
1. Virusstämme	21
2. Herstellung von Virussuspensionen	21
3. Virustitrierungen	22
4. Zellkulturen	22
5. Immunseren	23
6. Versuchstiere und Blutentnahme	23

	Seite
7. Herstellung der komplementbindenden (KB)Antigene	23
a) Hamsterleber-Antigen	23
b) Antigen aus ENS-und BHK-21-Kulturen	24
8. Technik der Komplementbindungsreaktion	24
9. Technik des Neutralisationstestes	25
10. Bakteriologische Prüfungen	25
II. Versuche und Ergebnisse	26
1. Komplementbindendes Antigen aus Zellkulturen	26
2. Vergleich von KB-Antigen aus BHK-21-Kulturen mit KB-Antigen aus Lebern infizierter Goldhamster	28
3. Serologische Untersuchungen über die Verbreitung von Rhinopneumonitis-Infektionen im Bezirk Oberbayern unter Verwendung von BHK-Kulturantigen	28
4. Untersuchungen über die Bildung von komplement- bindenden Antikörpern nach der Impfung von Mäusen und Goldhamstern mit attenuiertem Rhinopneumonitis- virus	29
a) Untersuchungen an Mäusen	29
b) Untersuchungen an Goldhamstern	30
D. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE	32
E. ZUSAMMENFASSUNG	35
F. LITERATURVERZEICHNIS	36
LEBENS LAUF	44

A. Einleitung

Das Rhinopneumonitisvirus der Pferde oder Virus des Stutenaborts gehört zu den Herpesviren und wurde als Herpesvirus equi I klassifiziert. In Deutschland ist es enzootisch weit verbreitet. Der Stutenabort und die Rhinopneumonitis - Infektion, die durch dieses Virus ausgelöst werden, stellen eine erhebliche Belastung für die Zucht und Nutzung unserer Pferde dar.

Die Diagnose akuter Infektionen wird über die Isolierung des Rhinopneumonitisvirus geführt. Sie erfolgt durch die Anzüchtung in empfänglichen Zellkulturen, den Nachweis eines cytopathischen Effektes und eine anschließende Typifizierung im Neutralisationstest bzw. durch die Darstellung der typischen intranukleären Einschlüsse in infizierten Kulturzellen.

Im Gegensatz zur Einzeldiagnose ist für die Seuchenbeobachtung besonders die Ermittlung des Verseuchungsgrades mit einem Erreger wichtig. Für das Rhinopneumonitisvirus geschieht dies am besten durch die Untersuchung von Serumproben auf neutralisierende und komplementbindende Antikörper. Der Serumneutralisationstest erfordert jedoch einen erheblichen Arbeitsaufwand. Der Einsatz der Komplementbindungsreaktion ist deshalb bei solchen diagnostischen Untersuchungen vorzuziehen.

Für die Rhinopneumonitis-Komplementbindung mußte man bisher Antigene aus Lebern und Lungen infizierter Hamster herstellen. Solche Antigene haben den Nachteil, daß sie nur beschränkt haltbar sind und für die Reaktion nachteilige Eigenschaften besitzen. Aufgabe vorliegender Arbeit war es zunächst zu untersuchen, ob sich aus infizierten Zellkulturen komplementbindende Antigene herstellen lassen, ob diese Antigene den Hamsterantigenen gleichwertig sind und wie sie sich in der Routinediagnostik an Serumproben bewähren. Aus den letztgenannten Serumuntersuchungen sollten gleichzeitig orientierende Angaben über die Verbreitung des Rhinopneumonitisvirus in

der weiteren Umgebung Münchens gewonnen werden.

Für die Immunprophylaxe des Stutenaborts stehen zu Zeit Lebendimpfstoffe aus attenuierten Rhinopneumonitisvirus-Stämmen zur Verfügung. Die Wirksamkeit dieser Vakzinen kann bis jetzt nur an Pferden und nur an solchen Tieren geprüft werden, die nachweislich noch keine Infektion durchgemacht haben. Es wäre deshalb vorteilhaft, wenn für Wirksamkeitsprüfungen ein kleines Versuchstier eingesetzt werden könnte.

Unter diesem Gesichtspunkt wurde im zweiten Teil der Arbeit die Bildung virusneutralisierender und komplementbindender Antikörper bei Mäusen und Goldhamstern nach der Impfung mit attenuiertem Rhinopneumonitisvirus untersucht.

B. S c h r i f t u m

I. Antigener Aufbau des Rhinopneumonitisvirus

Das Rhinopneumonitisvirus (RV) verhält sich immunologisch weitgehend einheitlich. Nach allen bisherigen Beobachtungen und Untersuchungen besitzt das Virus keine immunologisch selbständigen Typen. Man unterscheidet jedoch heute zwei Subtypen (SHIMIZU u. Mitarb., 1963; Mayr u. Mitarb., 1965), den Subtyp I, der durch den Stamm Kentucky-D (DOLL u. WALLACE, 1954) repräsentiert wird und den Subtyp II, dem bisher alle isolierten asiatischen und europäischen Stämme angehören. Zwischen den beiden Subtypen bestehen weitgehende antigene Beziehungen. Inwieweit sie sich immunologisch decken, ist jedoch noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen worden. Unterschiede zwischen dem Subtyp I und Subtyp II konnten bisher nur anhand des Virus-Neutralisationstestes im Kreuzversuch quantitativ nachgewiesen werden, nicht jedoch serologisch in der Komplementbindungsreaktion. Nach MAYR (persönliche Mitteilung) bestehen auch keinerlei antigene Unterschiede zwischen europäischen und japanischen RV-Stämmen. Die serologischen Beziehungen zwischen dem Subtyp I und II werden durch die Tatsache untermauert, daß in verschiedenen Ländern bei Pferden Serumantikörper gegen beide Subtypen zugleich gefunden wurden, was teilweise zu Diskussionen über einen eventuell dritten, intermediären Subtyp führte (SHIMIZU u. Mitarb., 1963).

Neben seinem immunisierenden Prinzip enthält das RV komplementbildende Antigene, ein präzipitierendes Antigen, ein Hämagglutinin und das Normalkomponenten-Antigen.

1. Das immunisierende Prinzip

Das immunisierende Prinzip wird durch den Gesamtviruskomplex des RV dargestellt und induziert die Bildung einer humoralen und zellulären Immunität in infizierten Organismen. Früher glaubte man (MANNINGER u. MOSCY, 1959), daß eine Infektion mit dem RV eine dauerhafte, möglicherweise lebenslange Immunität hinterläßt.

Diese Annahme wurde jedoch durch Beobachtungen von DOLL (1961); DOLL u. BRYANS (1963a), sowie durch zahlreiche andere Untersuchungen (DOLL u. Mitarb., 1955; DOLL u. BRYANS, 1962; GOIS u. SKODA, 1962; KAJI, 1963; PETZOLD u. Mitarb., 1966; LINDEMANN u. Mitarb., 1967) nicht bestätigt. Nach DOLL u. Mitarb. (1955) ist die Rhinopneumonitis-Immunität sehr variabel und z.T. sogar unvollständig. Die Autoren beobachteten unter anderem, daß Stuten sogar hintereinander nach Rhinopneumonitis-Infektionen abortieren können und daß auch bei Tieren mit höheren Antikörpertitern im Serum Reinfektionen möglich sind. Hierfür wird ein rasches Nachlassen der örtlichen Gewebesimmunität an den Schleimhäuten des Geschlechts- und Atmungsapparates verantwortlich gemacht (DOLL u. Mitarb., 1955; DOLL u. BRYANS, 1963 b; MAYR u. Mitarb., 1965; BRION u. Mitarb., 1968).

Die Ausbildung der Immunität ist auch abhängig von der Verlaufsform einer überstandenen Rhinopneumonitis-Infektion. So können vor allem bezüglich humoraler Immunität große Unterschiede auftreten, je nachdem, ob z.B. die Abortform oder die respiratorische Form der Erkrankung vorlagen (vergl. Antikörperbildung).

Die Ausbildung einer Immunität gegen die Rhinopneumonitis der Pferde wird auch durch die Impfung mit attenuiertem RV erreicht. Für Lebendvakzinen stehen hamsteradaptierte Virusstämme von mäßiger Virulenz (DOLL, 1961) und besser attenuierte, kulturadaptierte Virusstämme (MAYR u. Mitarb., 1968; KUBIN u. KÖLBL, 1969) zur Verfügung. Diese Lebendvakzinen auf der Basis kulturattenuierter Virusstämme haben sich in der Praxis bewährt (MAYR, 1970).

Inaktiviertes RV besitzt schlechte immunisierende Eigenschaften. Bereits KRESS (1941) wie auch DOLL u. Mitarb. (1959 b, 1961, 1963 a) haben festgestellt, daß Vakzinen aus inaktiviertem RV nicht für prophylaktische Impfungen geeignet sind. Daneben können solche Antigen-Vakzinen auch hämorrhagischen Ikterus bei Fohlen und allergische Zustände bei Stuten auslösen.

2. Komplementbindende Antigene

Das RV besitzt nach SHIMIZU u. Mitarb.(1962), ISHIZAKI u. Mitarb.(1963) sowie ISHIZAKI u. SHIMIZU (1964) zwei voneinander trennbare komplementbindende Antigene, ein zellgebundenes RV-Antigen und ein vom Virus abtrennbares "lösliches" S-Antigen. Beide Antigene lassen sich in der Komplementbindungsreaktion nachweisen.

Diagnostisch wird komplementbindendes Antigen (KB-Antigen) nicht aufgetrennt, sondern als Gesamtextrakt aus infizierten Geweben verwendet. Als Ausgangsmaterial können Lungen von nach natürlicher oder künstlicher Infektion abortierten Foeten dienen. (BARTHA u. FEHER, 1954; TOPOLNIK u. Mitarb., 1955; SEMERDJIEV u. CHRISTOV, 1958; DOLL u. BRYANS, 1962; BERTHELOU u. GAUMONT, 1963; KAJI, 1963). Der Überstand einer 20%igen Lungenverreibung in physiologischer Kochsalzlösung dient als Antigen. Es kann nach DOLL u. Mitarb.(1953 a) über ein Jahr bei -18°C aufbewahrt werden. Nach der Adaptierung des RV an Hamster, erstmals vorgenommen von DOLL u. Mitarb.(1953 b), wurde in der serologischen Diagnostik hauptsächlich KB-Antigen aus den Lebern infizierter Junghamster hergestellt. Hierzu werden 6-8 Wochen alte Hamster (syrischer Goldhamster) mit hamsteradaptierten RV i.p. infiziert und erliegen nach einigen Tagen der Infektion. Die Lebern solcher Tiere werden zu einer 20%igen Suspension homogenisiert und mehrmals bei 3 000 UpM abzentrifugiert. Der letzte Überstand dient als KB-Antigen (DOLL u. BRYANS, 1962; KAWAKAMI u. Mitarb., 1962; SHIMIZU u. Mitarb., 1963; KAJI, 1963; PETZOLDT, LINDEMANN u. Mitarb., 1966, u. 1967; PETZOLDT, 1967; BRION u. Mitarb., 1968). Die Verwendung von KB-Antigenen aus Organsuspensionen ist jedoch mit Nachteilen behaftet. PETZOLDT (1967) schlug deshalb die Verwendung von KB-Antigenen aus infizierten Zellkulturen vor. Seine Versuche in dieser Richtung verliefen jedoch unbefriedigend. Die Herstellung von KB-Antigenen aus Zellkulturen gelang bisher nur SHIMIZU u. Mitarb. (1962) sowie KAWAKAMI u. Mitarb.(1962) aus infizierten Pferdenierenkulturen. Die Autoren infizierten dichte Kulturen mit hohen Virusdosen der RV-Stämme Kentucky-D

und H-45. Nach 3 Tagen trat ein vollständiger cytopathischer Effekt ein. Solche Kulturen wurden homogenisiert und bei 18 000 UpM abzentrifugiert. Hierdurch ließ sich das virusgebundene V-Antigen (Sediment) vom löslichen S-Antigen (Überstand) abtrennen.

Antigene Unterschiede zwischen den Subtypen I und II des RV konnten mit der Komplementbindungsreaktion bisher weder hinsichtlich V-Antigen noch beim S-Antigen nachgewiesen werden.

3. Präzipitierendes Antigen

Über das präzipitierende Antigen des RV sind noch wenig Einzelheiten bekannt. Der Nachweis dieses Antigens gelang MAYR u. Mitarb. (1965) bei Anwendung der Agargel-Präzipitation nach der Methode von WITTMANN (1958) in Kulturviruspräparaten der RV-Stämme Army 183, Kentucky-D, Hannover 1835, RAC-H und V 100-64 (Schweiz).

Erst nach einer Einengung der Kulturvirussuspensionen im Verhältnis 1:100 (Rotationsverdampfer, Ultrazentrifuge) wurden jedoch positive Reaktionen erzielt und zwar gegen Immunsereen aus Kaninchen und Meerschweinchen, sowie gegen hochtitrige Pferdesereen (Neutralisationstiter 1:512). Rhinopneumonitis-Rekonvaleszentensereen von Pferden reagierten nicht. Die Ergebnisse wurden von TEUBNER (1966) bestätigt. Mit normalen Kulturen des RV-Stammes RAC-H (Titer 10^7 KID₅₀/ml) erhielt er keine Präzipitationsbanden gegen präzipitinhaltige Immunsereen vom Kaninchen und Meerschweinchen. Positive Ergebnisse traten erst nach einer starken Einengung der Antigene auf.

Nach CARMICHAEL u. BARNES (1961) weisen das RV der Pferde und das Virus der infektiösen bovinen Rhinotracheitis der Rinder ein gemeinsames präzipitierendes Antigen auf. Die Autoren arbeiteten ebenfalls mit der Agargeltechnik nach WITTMANN (1958) und verwendeten Kulturantigene einerseits sowie Immunsereen aus Kaninchen, Meerschweinchen, Rindern und Schafen anderseits.

4. Hämagglutinin

1956 berichteten McCOLLUM u. Mitarb. über hämagglutinierende Eigenschaften des RV. Hamsteradaptiertes RV agglutinierte Erythrozyten vom Pferd. Mit Extrakten abortierter Foeten von Rhinopneumonitis - infizierten Pferden waren die Resultate unbefriedigend. SEMERDJIEV (1962) bestätigte die hämagglutinierenden Eigenschaften des RV gegenüber Pferde - und auch Meerschweinchenerythrocyten. In seinen Versuchen eigneten sich als hämagglutinierende Antigene am besten 10%ige Suspensionen aus Lebern und Lungen infizierter Hamster und auch infizierter Meerschweinchen sowie foetale infizierte Pferdungen. Die Hämagglutinationsmethode verbesserte SEMERDJIEV insofern, als er nach der Methode von GOLD u. Mitarb. (1958) formalinisierte Pferdeerythrozyten verwendete, die 90 Tage haltbar sind. Auch KUBIN u. KÖLBL (1966) wiesen das RV-Hämagglutinin bei Verwendung der Methode nach SEMERDJIEV nach.

Die hämagglutinierende Eigenschaft scheint nicht an das RV - Partikel gebunden zu sein (McCOLLUM u. Mitarb., 1956). Durch hochtourige Zentrifugation konnte das Hämagglutinin leicht vom infektiösen Virus abgetrennt werden. Die hämagglutinierende Aktivität virushaltiger Organsuspensionen geht nicht mit der Infektiosität parallel. Organe infizierter Goldhamster, die einen hohen Virustiter aufwiesen (Herz, Muskulatur), besaßen wenig oder kein Hämagglutinin. Nach Ansicht der Autoren wird das Hämagglutinin in den infizierten Geweben unterschiedlich stark ausgebildet. So war es in Leber, Lunge, Milz und Urin in großen Mengen nachweisbar im Gegensatz zu Herz, Muskulatur und Gehirn.

In der Hämagglutinations-Reaktion nach SEMERDJIEV (1962) werden Pferde- oder Meerschweinchenerythrocyten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung gewaschen, nach der Methode von GOLD u. Mitarb. (1958) formalinisiert und dann eine 1%ige Suspension (pH 7,4) hergestellt. Das hämagglutinierende Antigen wird 1:10 vorverdünnt, eine Verdünnungsreihe in 2er Potenzen angelegt und dann die Erythrocyten in gleicher Menge

zugesezt. SEMERDJIEV erzielte mit Antigen aus infizierten Meerschweinchenlungen und Pferdeerythrocyten Titer von 1:553 (durchschnittlicher Wert), mit dem gleichen Antigen und Meerschweinchenerythrocyten 1:293.

5. Das Normalkomponenten - Antigen

Wie alle Virusarten der Herpesgruppe besitzt das Rhinopneumonitisvirus auch ein Normalkomponenten-Antigen, das bei der Virussynthese als zelluläres Element in das Viruspartikelchen integriert (ROLLE u. MAYR, 1966). Es reagiert in der Komplementbindungsreaktion und in der Agargel-Präzipitation zellspezifisch.

II. Serologische Reaktionen bei der Rhinopneumonitis- Infektion des Pferdes

1. Neutralisationstest (NT)

Jones u. Mitarb. führten 1948 erstmals NT mit RV durch. Sie verimpften die Neutralisationsgemische auf Fohlen. DOLL u. Mitarb. (1959 a) beschrieben einen NT, bei dem sie hamsteradaptiertes RV des Stammes Kentucky-D und als Wirtssystem 4 - 6 Wochen alte Hamster verwendeten. Das Virus wurde in 10er Potenzen in physiologischer Kochsalzlösung unter Zusatz von 20% Normal-Pferdeserum verdünnt, die Virusverdünnungsstufen mit gleichen Mengen inaktivierten Immunserums gemischt, eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und pro Virusverdünnungsstufe 4 Hamster intraperitoneal infiziert (0,2 ml pro Tier). Im Kontrollversuch wurden unter gleichen Bedingungen Virusverdünnungen ohne Immunserumzusatz verimpft (0,1 ml pro Tier). Die Titer beider Versuche wurden anhand der Letalität errechnet. Der Unterschied zwischen der Titrierung mit Immunserumzusatz und der Kontrolltitrierung ohne Immunserum wurde als Serumneutralisationstiter gewertet und in LD₅₀ für Hamster pro 0,1 ml angegeben. Die Titer verschiedener untersuchter Pferde-Immunseren lagen zwischen

10^8 und 10^9 Hamster-LD₅₀/0,1 ml. Nach der gleichen Methode arbeiteten auch andere Autoren mit guten Ergebnissen (DOLL u. BRYANS, 1963 a; PLUMMER, 1964; BRION u. Mitarb., 1968).

In der Zwischenzeit hat die Zellkultur als Auswertungssystem den Hamster vollständig ersetzt. Die Technik des NT nach DOLL u. Mitarb. (1959 a) wurde später auch mit Zellkulturen durchgeführt (SHIMIZU u. Mitarb., 1959; SHIMIZU u. Mitarb., 1963; MAYR u. Mitarb., 1965).

Heute wird bei der Laborarbeit mit RV zwischen dem Virus-Neutralisationstest und dem Serum-Neutralisationstest unterschieden.

Als Virus-Neutralisationstest (Virusverdünnungsmethode) wird der NT zur Identifizierung und Typisierung von RV-Stämmen eingesetzt. Das zu prüfende Virus wird dabei in 4 - oder 10er Potenzen verdünnt, die Verdünnungsstufen mit der gleichen Menge einer Standardverdünnung des vorgeprüften Immunserums (mindestens der 8fache Endtiter des Serums) gemischt, die Gemische inkubiert und dann in der Menge von 0,2 ml pro Reagent verimpft. Parallel werden Virus- und Normalserumkontrollen angesetzt.

Die Inkubation wird unterschiedlich vorgenommen: GOIS u. SKODA (1962) empfehlen 1 Std., KUBIN u. KÖLBL (1966) 2 Std., SHIMIZU u. Mitarb. (1963) sowie MAYR u. Mitarb. (1965) 4 Std. bei + 4°C.

Das Ergebnis eines Virus-Neutralisationstestes wird als Neutralisationsindex (Log 4 bzw. Log 10) angegeben. Der Neutralisationsindex ist die Differenz zwischen dem Virustiter gegen Normalserum und dem gegen das Immunserum (SHIMIZU u. Mitarb., 1963; MAYR u. Mitarb., 1965). Da die virusneutralisierenden Antikörper streng typen- und bis zu einem gewissen Grad auch subtypenspezifisch sind, wird der Virus-NT zur Typifizierung isolierter Virusarten und daneben hauptsächlich zur Untersuchung serologischer Beziehungen zwischen Virusstämmen eingesetzt.

Der Serum-Neutralisationstest (Serumverdünnungsmethode) wird zum quantitativen Nachweis virusneutralisierender Serum-

antikörper verwendet. Hierbei wird eine konstante Virusmenge von mindestens 100 kulturinfektösen Dosen ($KID_{50}/0,1$ ml) mit der gleichen Menge in 2er Potenzen fallender Serumverdünnungen gemischt und nach einer Bindungszeit auf das Nachweissystem verimpft. In der Regel beimpft man 4 Kulturröhrchen pro Verdünnungsstufe mit je 0,2 ml. Das Ergebnis des Testes wird an Hand des cytopathischen Effektes abgelesen. Der Neutralisationstiter eines Serums wird nach REED u. MUENCH (1938) oder KAERBER (1931) errechnet und als arithmetischer Wert bzw. in $\log 2$ ausgedrückt.

2. Komplementbindungsreaktion (KBR)

RANDALL u. Mitarb. (1950) beschrieben zum ersten Mal die Anwendung der KBR zur Serumantikörper-Bestimmung bei Stuten, die abortiert hatten. Die Ablesung nahmen sie mit der 50% Endpunktbestimmung spektrophotometrisch vor. DOLL u. Mitarb. (1953 a) untersuchten in einer verbesserten Technik Lungen abortierter Fohlen auf KBR-Antigen. Die KBR nach der Methode von DOLL u. Mitarb. wurde vielfach mit gutem Erfolg angewandt. (BARTHA u. FEHER, 1954; TOPOLNIK u. Mitarb., 1955; SEMERDJIEV u. CHRISTOV, 1958; GOIS u. SKODA, 1962; BERTHELOU u. GAUMONT, 1963).

KAWAKAMI u. Mitarb. (1962) benutzten erstmals die Technik nach KOLMER-BOERNER (1941) mit der Kältebindung. Diese, von SHIMIZU u. Mitarb. (1963) genau beschriebene und von PETZOLDT (1967) etwas modifizierte KBR-Technik wird heute vorwiegend verwendet. Dabei wird das KB-Antigen aus infizierten Lebern von Hamstern hergestellt. Immuns Serum, das zur Antigen-titrierung und zur Virusidentifizierung benötigt wird, kann aus Meerschweinchen, Kaninchen, Hamstern und Pferden hergestellt werden.

Die für die Serumproduktion vorgesehenen Tiere werden mit adaptierten RV mehrmals in Abständen von ca. 1 - 3 Wochen geimpft und etwa 1 Woche nach der letzten Impfung entblutet. Solche Seren enthalten KB-Antikörpertiter zwischen 1:4 und 1:128. Das bei der KBR benötigte Komplement wird üblicherweise von der Industrie bezogen.

Im Vorversuch wird das Komplement im Beisein von Serum oder Antigen ausgewertet. Die höchste Komplementverdünnung, die eine komplette Hämolyse bewirkt, wird als eine Komplementeinheit angenommen. Im Hauptversuch wird mit zwei Komplementeinheiten gearbeitet. Nach der Austitrierung des KB-Antigens (2er Potenzen) gegen 4 - 8 KB-Serumeinheiten eines bekannten Immunserums wird bei Serumtitrierungen mit Hilfe der KBR im Hauptversuch mit 4 Antigeneinheiten gearbeitet. Antigen, Serum und Komplement werden durch entsprechende Kontrollen überprüft. Als positiv werden diejenigen Serumverdünnungen bewertet, die die Hämolyse vollständig hemmen (starker Bodensatz mit klarem Überstand als 4+ Reaktion) und die die Hämolyse fast hemmen (starker Bodensatz mit geringfügigem hämolytischen Überstand als 3+ Reaktion) (Paulsen, 1966; PETZOLDT, 1967). Da die komplementbindenden Antikörper innerhalb von 7 Tagen p.i. erscheinen und nach 30 p.i. in der Regel signifikant zurückgehen, eignet sich die KBR am besten für die Diagnose akuter Rhinopneumonitisinfektionen. Dabei werden zwei Serumproben untersucht (Serumpaar).
Liegt (nach DOLL u. BRYANS (1962)) bei einem Serum des Paares ein 4 - 8facher Titeranstieg vor, so handelt es sich um eine akute Infektion.

3. Hämagglutinationshemmungsreaktion (HAH)

Die HAH hat in der Diagnose und bei der Laborarbeit mit RV noch keine routinemäßige Anwendung gefunden. Die HAH baut auf der HA nach SEMERDJIEV auf. Serumproben werden in 2er Potenzen verdünnt und mit 4 HA-Einheiten eines guten HA-Antigens gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten werden die Blutkörperchen zugegeben.

Das Serum von Stuten hemmte nach natürlicher Infektion in den Versuchen von McCOLLUM u. Mitarb. (1956) die Hemmagglutination nicht. Nur durch mehrmalige Injektion von formolinaktiviertem Virus aus Hamsterlebern konnten die Autoren beim Pferd die Bildung von HAH-Antikörpern erreichen.

SEMERDJIEV (1962) stellte dagegen bei Pferden, die nach natürlicher oder künstlicher Infektion abortiert hatten, deutliche HAH-Antikörper fest. Sie lagen maximal bei 1:256. Nach Ansicht von SEMERDJIEV kann deshalb diese Reaktion parallel zur KBR zur schnellen Diagnose der RV-Infektion angewandt werden.

4. Präzipitation im Agargel (PR)

Die Rhinopneumonitis-PR wurde bisher durchwegs im Agargel durchgeführt. Vorwiegend wurde dabei die von WITTMANN (1958) beschriebene Methode angewandt. Nach TEUBNER (1966) ist auch die Methode nach SCHÖOP geeignet.

Der Agar wird nach seiner Auflösung auf pH 7,0 eingestellt und 3 ml in Petrischalen pipettiert. Nach dem Erstarren des Agars werden 5 Löcher eingestanz, ein zentrales und 4 periphere. Das PR-Antigen wird in das zentrale Loch und die Immunseren bzw. die Serumkontrollen in die peripheren Löcher eingefüllt. Die Reaktion wird bei Zimmertemperatur inkubiert. 3 Tage hintereinander werden sowohl Antigen als auch Immunseren nachgefüllt. Die Ablesung erfolgt über einem dunklen Untergrund.

Wie bereits erwähnt, kann Antigen aus Zellkulturen nur dann eingesetzt werden, wenn es stark eingeeengt wird. Als Immunseren haben sich vor allem Seren von Meerschweinchen bewährt. Seren infizierter Pferde ergeben nur selten positive Präzipitationsbanden.

Bei der Beurteilung der Präzipitationsbanden ist darauf zu achten, daß neben der virusspezifischen Präzipitation stets auch eine Reaktion mit dem Normalkomponenten-Antigen eintreten kann (MAYR u. Mitarb., 1965). Die beiden Präzipitationsbanden, spezifische und Normalkomponentenbande, lassen sich durch die Normalkomponenten-Antigene voneinander unterscheiden.

5. Fluoreszenzserologische Reaktion

Über die Anwendung der Immunofluoreszenz bei der Rhinopneumonitis-Diagnostik liegen noch wenige Erfahrungen vor. Auch hier kann die direkte Technik oder die indirekte fluoreszenzserologische Färbung angewendet werden. Die Fluoreszenzserologie wurde bei Rhinopneumonitis-Infektion vornehmlich zur Markierung von Antigen in infizierten Geweben eingesetzt. (HOGGAN u. Mitarb., 1961; ISHIZAKI u. Mitarb., 1963; ISHIZAKI u. SHIMIZU, 1964).

WEILAND u. DIMITRIAS (1970) wandten die direkte Technik der Immunofluoreszenz auch diagnostisch an. Sie untersuchten 70 Tiere, von denen 24 positiv und 44 negativ waren. Die Ergebnisse stimmten mit den Befunden überein, die sie über die kulturelle Virusisolierung erhielten. In zwei Fällen verlief die Immunofluoreszenz positiv, während die Kulturisolierung negativ ausfiel.

III. Antikörperbildung bei der Rhinopneumonitisinfektion

1. Allgemeines

Untersuchungen über die Entwicklung von RV-Antikörpern, den zeitlichen Ablauf und die quantitativen Verhältnisse, liegen bisher nur beim Pferd vor. Im Verlaufe einer RV-Infektion des Pferdes werden virusneutralisierende und komplementbindende Serumantikörper gebildet (DOLL u. Mitarb., 1955; DOLL u. BRYANS, 1962; GOIS u. SKODA, 1962; PLUMMER u. WATERSON, 1963; SHIMIZU u. Mitarb., 1963; PETZOLDT u. Mitarb., 1966; CRANDELL, 1967). Vom Nachweis von präzipitierenden und hämagglutinationshemmenden Antikörpern wird sehr selten berichtet. (McCOLLUM u. Mitarb., 1956; GARMICHAEL u. BARNES, 1961; SEMERDJIEV, 1962; SHIMIZU u. Mitarb., 1963; MAYR u. Mitarb., 1965; KUBIN u. KÖLBL, 1966).

Die zeitliche Entwicklung der verschiedenen Antikörperarten verläuft unterschiedlich. Während die komplementbindenden Antikörper in der Regel schon nach einer Woche erfaßbar sind und in der fünften Woche üblicherweise wieder abfallen, erscheinen die virusneutralisierenden Antikörper erst später im Serum und halten wesentlich länger an. Über den Verlauf von präzipitierenden und hämagglutinationshemmenden Antikörpern liegen keine Angaben vor.

Große Unterschiede bestehen auch hinsichtlich der Antikörperentwicklung bei der Abortform der RV-Infektion und der respiratorischen Form.

2. Antikörperbildung bei der Abortform

Bei der RV-Infektion der Stute, die mit einem Abort einhergeht, kommt es regelmäßig zur Bildung virusneutralisierender, komplementbindender und präzipitierender Antikörper (SHIMIZU u. Mitarb., 1963).

DOLL u. Mitarb., (1953 a) wiesen bei 50 natürlich infizierten Stuten, die trächtig waren, regelmäßig komplementbindende

Antikörper nach. Die Titer lagen zwischen 1:2 und 1:256. Zur Zeit des Abortes oder kurz danach fielen die Titer allmählich wieder ab. Titeranstiege konnten in keinem Falle im Anschluß an die Aborte beobachtet werden. Bei im 7. bis 8. Trächtigkeitsmonat künstlich infizierten Stuten stellten die Autoren komplementbindende Antikörpertiter zwischen 1:4 und 1:1024 fest. Ab der 4. Woche nach der Infektion fielen die Titer ständig wieder ab und stiegen selbst nach dem Abort nicht an.

LINDEMANN u. Mitarb. (1967) wiesen bei nach natürlicher Infektion abortierenden Stuten ebenfalls regelmäßig komplementbildende Antikörper nach. Die Titer lagen zwischen 1:4 und 1:128. Frühestens am 125. Tag vor dem Abort konnten Titer von 1:4 erfaßt werden. Zwischen dem 23. Tag p. inf. und dem 4. Tag vor dem Abort hatten einige Tiere noch keine Komplementbindungstiter, am Tage des Abortes oder innerhalb von 26 Tagen danach reagierten die Tiere jedoch positiv mit Titern zwischen 1:32 und 1:128. Am Tage der Aborte haben die Autoren Komplementbindungstiter zwischen 1:16 und 1:128 feststellen können. Die komplementbindenden Antikörper waren bei nahezu allen Tieren erst nach 25 - 92 Tagen nicht mehr erfaßbar.

KUBIN u. KÖLBL (1966) stellten bei abortierenden Stuten nach natürlicher RV-Infektion ebenfalls komplementbindende Antikörper fest. Zur Zeit der Aborte waren Titer von 1:10 und 1:40 nachweisbar, vereinzelt auch in der Höhe von 1:320. Nach einem Monat gingen die Titer signifikant zurück, einige Tiere waren um diese Zeit bereits negativ. Neutralisierende Antikörper konnten KUBIN u. KÖLBL erst nach Aborten mit Titern zwischen 1:16 und 1:512 feststellen.

Aus den serologischen Untersuchungen von DOLL u. Mitarb., LINDEMANN u. Mitarb. sowie KUBIN u. KÖLBL geht hervor, daß der Zeitpunkt des Abortes mit der Höhe der Serumantikörper in keinem Zusammenhang steht.

DOLL u. BRYANS (1962) untersuchten die Bildung der komplementbindenden und neutralisierenden Antikörper bei künstlich

infizierten Stuten. Sie infizierten die Stuten mit hamster-adaptierten RV-Antigen, Stamm Kentucky-D. Die KB-Antikörper waren nach 4 bis 6 Tagen p. inf. erstmals erfaßbar, stiegen dann an und erreichten Maximalwerte von 1:128 bis 1:256 innerhalb von 7 bis 10 Tagen p. inf. Anschließend blieben die Titer bis zum 30. Tage konstant, um dann rasch wieder abzusinken. Nach 6 Monaten waren keine komplementbindenden Antikörper mehr nachweisbar. Virusneutralisierende Antikörper konnten erst nach 6 bis 7 Tagen p. inf. nachgewiesen werden; sie erreichten die höchsten Titer jedoch erst nach 12 bis 20 Tagen und blieben 1 bis 2 Jahre nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse erhielt KAJI (1963) sowie SHIMIZU u. Mitarb. (1961, 1963). KAJI berichtet jedoch, daß er in einigen Fällen komplementbindende Antikörper bis zu 2 Jahren nachweisen konnte.

Nach einer Impfung mit Lebendimpfstoffen (in Schweinenierenkulturen attenuiertes RV der 185. bis 256. Passage) stellten MAYR u. Mitarb. (1968) fest, daß Stuten 14 Tage p. vacc. einen Serumneutralisationstiter zwischen 1:8 und 1:45 aufwiesen. Die Antikörper stiegen bis zum 40. Tag weiter bis auf Titer von 1:64 an und waren 6 Wochen nach der Vakzination nur leicht abgefallen. Eine Wiederholungsimpfung bewirkte nur einen leichten Boostereffekt mit geringfügigem Titeranstieg. Die serumneutralisierenden Antikörper blieben dann jedoch 6 Monate lang konstant. Von ähnlichen Ergebnissen berichten auch KUBIN u. KÖLBL (1969). Sie beobachteten ferner, daß Stuten, die vor einer Impfung in der KBR negative Werte hatten, nach der Impfung einen Titeranstieg bis 1:10 aufwiesen und daß Tiere mit einem Titer von 1:10 vor der Impfung nach der Impfung keine Titerveränderung zeigten.

3. Antikörperbildung bei der respiratorischen Verlaufsform

Bei der respiratorischen Verlaufsform der Rhinopneumonitis, die vornehmlich bei jungen Pferden auftritt, entsteht nach einer natürlichen Infektion nicht immer eine humorale Immunität (DOLL u. BRYANS, 1963 a u. b). Die Infektion läuft meist lokal an den Schleimhäuten ab, so daß es nur zu einer örtlichen Immunität kommt, die nach 1 bis 4 Monaten wieder verschwinden kann. Nach künstlicher Infektion mit hamsteradaptierten RV stellten DOLL u. BRYANS (1962) sowie SHIMIZU u. Mitarb. (1961 u. 1963) fest, daß KB-Antikörper bei jungen Pferden 8 bis 10 Tage nach einer Impfung feststellbar sind. Die höchsten Werte von etwa 1:64 erreichen die Tiere 14 bis 20 Tage p. vacc., sie bleiben etwa bis zum 30. Tage konstant und fallen dann rasch wieder ab, so daß sie nach 4 Monaten nicht mehr nachweisbar sind. Virusneutralisierende Antikörper im Serum erschienen 9 bis 12 Tage p. vacc.. Nach 14 bis 20 Tagen wurde der höchste Titer erreicht.

Im Anschluß an eine intranasale Vakzinierung mit Lebendimpfstoffen aus Kulturvirus von einer Dosis von $10^{6,5}$ KID₅₀/ ml zeigten Fohlen nur eine geringe Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern. Innerhalb von 14 Tagen bis 35 Tagen p. vacc. ließen sich Titer von 1:2 bis 1:4 nachweisen (MAYR u. Mitarb., 1968). Eine Wiederholungsimpfung, die 6 Wochen später vorgenommen wurde, führte jedoch zu einem deutlichen Anstieg der neutralisierenden Antikörper auf Titer von 1:8 bis 1:64. Ähnliche Beobachtungen machten auch DOLL u. BRYANS (1962) sowie KUBIN u. KÖLBL (1969). Die intravenöse Impfung mit Lebendimpfstoffen führte am raschesten zu einem Titer von 1:16 (virusneutralisierende Antikörper), der aber nach einer Wiederholungsimpfung nicht mehr anstieg (MAYR u. Mitarb., 1968).

KUBIN u. KÖLBL (1969) stellten bei Fohlen fest, daß sie nach der Impfung mit Lebendimpfstoff aus Kulturvirus komplementbildende Antikörper mit dem Titer von 1:5 bis 1:40 aufwiesen, dagegen keine neutralisierenden Antikörper entwickelt hatten.

C. Eigene Untersuchungen

I. Material und Methoden

1. Virusstämme

In allen Untersuchungen wurde der Stamm RAC-H des Herpesvirus equi I verwendet. Das Virus wurde in primären Schweinenierenkulturen (ENS-Kulturen) vermehrt.

Als Ausgangsmaterial für die Versuche zur Herstellung eines komplementbindenden Kulturantigens diente die 18. Kulturpassage des RAC-H-Stammes, zur Infektion von Hamstern (Hamsterleberantigen) vollvirulentes Virus der 9. Hamsterpassage. Zu den Neutralisationstesten sowie in den Versuchen über die Antikörperbildung bei Mäusen und Goldhamstern, wurde attenuiertes RAC-H Virus der 419. Passage in ENS-Kulturen herangezogen.

Vergleichend eingesetzt wurden ferner die Virusstämme Vaccinia Ankara (Poxvirus commune) und Aujeszky-Hannover II (Herpesvirus suis I), beide als Kulturvirus aus ENS-Kulturen.

2. Herstellung von Virussuspensionen

ENS-Kulturen in Roux-Flaschen bzw. gleichartige Kulturen von BHK-21-Zellen wurden nach der Adsorptionsmethode infiziert. Hierbei wurden, nach der Entfernung des Anzuchtmediums, die Kulturen mit 20 ml Earle'scher Lösung gewaschen, dann mit 10 ml einer hochtitrigen Virussuspension beschickt und 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 90 ml Erhaltungsmedium aufgefüllt und die Kulturen weiterbebrütet.

An die Virusernte am Höhepunkt der Virusvermehrung schloß sich ein einmaliges Gefriertauen (-65°C) der Kultur und eine leichte Ultraschallbehandlung an, der eine grobtourige Abzentrifugierung folgte. Der Überstand wurde in Portionen von ca. 5 ml bei -65°C aufbewahrt.

3. Virustitrierungen

Sie wurden in ENS-Kulturen (Röhrchenkulturen) durchgeführt und dabei pro Verdünnungsstufe (10er Potenzen) 4 Röhrchen mit je 0,1 ml Virussuspension beimpft. Die Titerberechnung erfolgte an Hand des cytopathogenen Effektes (cpE) (Endab-
lesung nach 7 Tagen) nach KAERBER (1931) in kulturinfektiösen
Dosen ($KID_{50}/1$ ml).

4. Zellkulturen

Primäre Schweinenierenkulturen (ENS-Kulturen) sind von der Nierenrinde frischgeschlachteter Schweine mittels Dauertrypsinierung über 4 - 5 Stunden bei Zimmertemperatur hergestellt worden. Die Kulturen wurden stationär angelegt. Als Anzuchtmedium diente Earlesche Lösung (80Vol.%) mit Kälberserum (10%), Laktalbumin-hydrolysat in 5%iger Lösung (10%) und Zusatz von Phenolrot und Antibiotika. Nach 3 Tagen erfolgte eine Erneuerung des Anzuchtmediums. Die Kulturen waren in der Regel nach 6 Tagen zur Einschichtkultur ausgewachsen und wurden dann auf Erhaltungsmedium, bestehend aus Virusmedium 2a (VM2a) (SCHWÖBEL u. TRAUB, 1959) mit Phenolrot und Antibiotika, umgesetzt.

Die BHK-21-Zellen wurden mittels Abtrypsinierung und Neuaussaat im Verhältnis 1:4 bis 1:5 vermehrt. Das Anzuchtmedium bestand in Hanksscher Lösung mit Yeast Extrakt, Laktalbumin-hydrolysat, Phenolrot und Antibiotika in den üblichen Konzentrationen sowie 10% Kälberserum.

Dichtgewachsene Kulturen wurden vor der Infektionsphase mit VM2a beschickt.

5. Immuneren

Das in den Versuchen benötigte Rhinopneumonitis-Immunserum wurde von Meerschweinchen nach einer Impfung und zweimaligen Boosterung mit ENS-Kulturvirus des Stammes RAC-H der 20. Kulturpassage gewonnen. Es besaß einen Komplementbindungstiter von 1:128. Vergleichend wurden auch Immuneren von Pferden, die mehrmals mit RV, Stamm RAC-H der 390. Passage (attenuiert), geimpft worden waren, herangezogen.

6. Versuchstiere und Blutentnahme

Die in den Versuchen verwendeten weißen Mäuse entstammten der institutseigenen Zucht (Abstammungszucht II der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten Tübingen). Sie waren bei der Verwendung etwa 10 Wochen alt (15 g). Die Blutproben wurden nach Äthernarkose und Durchtrennung der Arteria carotis communis gewonnen (Entbluten).

Die syrischen Goldhamster wurden im Alter von etwa 12 Wochen gekauft. Die Blutentnahme erfolgte durch Herzpunktion in Äthernarkose, wobei aus den Tieren jeweils etwa 0,5 bis 1 ml Blut gewonnen wurde. Zur Gewinnung von Antigen (Hamsterleberantigen) wurden 8 Wochen alte syrische Goldhamster mit vollvulentem RV, Stamm RAC-H, der 3. Goldhamsterpassage (0,2 ml i.p.) infiziert. Sie erlagen der Infektion zwischen 2 und 7 Tagen p. inf.

7. Herstellung der komplementbindenden (KB) Antigene

a) Hamsterleber-Antigen

Steril entnommene Lebern infizierter und frisch verendeter Goldhamster wurden im Verhältnis 1:10 mit m/90 Kochsalzlösung im Mörser fein verrieben und die Suspension dreimal hintereinander bei 2 500 UpM abzentrifugiert. Der letzte Überstand diente als KB-Antigen und wurde bei +4°C gelagert.

b) Antigen aus ENS- und BHK-21-Kulturen

Infizierte Zellkulturen in Roux-Flaschen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Zellphasen in konzentrierter Form aufgeschlossen. Einzelheiten der Antigengewinnung sind im Text der Versuche vermerkt.

8. Technik der Komplementbindungsreaktion (KBR)

Es wurde die modifizierte Technik nach KOLMER u. BOERNER (1947) mit Kältebindung angewandt. Diese Technik ist in Einzelheiten von PETZOLDT (1967) beschrieben worden.

In Vorversuchen wurden jeweils das Komplement im Beisein von Antigen und von Serum ausgewertet und die Komplementgebrauchsdosen ermittelt. Dabei wurde die Komplementverdünnungsreihe in % hergestellt (7%, 6%, 5%, 4,5%, 4%, 3,5%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%).

Die Erythrozytensuspension bestand aus 4%igen gewaschenen Hammelerythrozyten. Sie wurden mit der gleichen Volumenmenge eines Ambozeptors (4 minimallösende Dosen) gemischt.

In Hauptversuchen wurde dann mit 2 Komplementeinheiten gearbeitet.

Das Meerschweinchen-Komplement und der hämolytische Ambozeptor wurden von der Firma Behringwerke AG bezogen.

In den Hauptversuchen zur Antigentitrierung wurde das Antigen in 2er Potenzen verdünnt. Das Serum wurde zu einer 4fach geringeren Konzentration verdünnt, als die des Endtiters. Diese Konzentration stellte die Serum-Gebrauchsverdünnung dar (4KB-Serumeinheiten).

In den Hauptversuchen zur Serumtitrierung wurde das Serum in 2er Potenzen verdünnt. Als Antigen-Gebrauchsverdünnung wurde mit der 2fach geringeren Verdünnung als der des Endtiters gearbeitet. (2 KB- Antigeneinheiten).

Pro Teströhrchen wurde das Antigen, dann Serum und Komplement (je 0,1 ml) einpipettiert und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Anderntags wurde das Hämolytische System (0,2 ml pro Röhrchen) zugefügt und sämtliche Röhrchen bei 37°C im Wasserbad für 30 Min. inkubiert.

Jeder Versuchsansatz wurde durch eine Antigen-, Serum- und Systemkontrolle abgesichert.

9. Technik des Neutralisationstestes

Es wurde der Serumneutralisationstest eingesetzt (Serumverdünnungsmethode). Konstante Virusmengen (100 KID₅₀/0,1 ml) wurden mit gleichen Teilen des zu prüfenden Serums (Serumverdünnungen in 2er Potenzen) gemischt, bei 4°C über 4 Stunden inkubiert und dann die Neutralisationsgemische auf 4 ENS-Kulturröhrchen je Serumverdünnungsstufe á 0,2 ml verimpft. Entsprechende Kontrollen (Viruskontrolle mit Titration der Testvirusdosis, positive Serumkontrollen, Normalserumkontrolle) liefen parallel. Die Auswertung und Titerberechnung erfolgt wie bei den Titrationen.

10. Bakteriologische Prüfungen

Virusstämme, Virussuspensionen, Antigen und Immunseren wurden nach üblichen Verfahren vor einer Antibiotikazugabe auf bakterielle Verunreinigungen geprüft. Unsteriles Material wurde verworfen.

II. Versuche und Ergebnisse

1. Komplementbindendes Antigen aus Zellkulturen

In einem Vorversuch war zunächst untersucht worden, ob Virusernten aus RAC-H infizierten ENS-Kulturen (Gesamtvirus aus Medium und Zellphase), die am Höhepunkt der Virusvermehrung geerntet worden waren, als KB-Antigen brauchbar sind. Die Ergebnisse waren insofern unbefriedigend, als die KB-Titer der Antigene nur Werte von 1:8 bis 1:16 erreichten.

Das Verfahren der Antigengewinnung wurde deshalb abgeändert und wie folgt vorgegangen:

Dichte ENS-Kulturen in Roux-Flaschen wurden einheitlich mit 10^7 KID₅₀ mittels Adsorptionsmethode infiziert (phenolrot-freies Medium) und in Zeitabständen von 10, 15, 20 und 25 Stunden p. inf. geerntet. Vor der Ernte wurde das Virus-medium jeweils bis auf 5 ml pro Roux-Flasche abgezogen, die Zellphase der Kultur nur in diesen 5 ml aufgenommen und über einmaliges Gefriertauen (-65°C) sowie Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach grobtouriger Zentrifugation stellte der Überstand die jeweilige Antigenprobe dar. Diese Proben wurden zur Feststellung des Virusgehaltes in Zellkulturen und zur Ermittlung des Antigengehaltes in der KBR titriert. Entsprechende Normalantigene aus nichtinfizierten Kulturen (ENS) liefen parallel, desgleichen nach gleicher Methode gewonnenes KB-Antigen von Vaccinia- und Aujeszkyvirus. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Tabelle I enthalten.

Die nach 20 - 25 Stunden gewonnenen Antigene zeigten die besten KB-Titer. Auch die Kontrollantigene, aus Normalkultur, aus Vacciniavirus und Aujeszkyvirus infizierten Kulturen reagierten jedoch 1:16 positiv. Diese Reaktion kann eindeutig als Bindung von ENS-Zellantigenen mit homologen KB-Antikörpern gedeutet werden.

Die Meerschweinchen, deren Immunserum im Versuch eingesetzt wurde, waren mit ENS-Kulturvirus immunisiert worden.

Tabelle I : Virus-Titer und KB-Titer von KB-Antigen aus
ENS-Kulturen gegen 4 KB-Serumeinheiten von
Meerschweinchen - Immunserum

Virusstämme	Antigenernte Stunden p.inf.	Status der infizierten Kulturen	Virus- Titer in -log ₁₀ /ml	KB-Titer
RAC-H	10	ca. 5% cpE	6,75	1:16
RAC-H	15	ca. 10%cpE	7,0	1:32
RAC-H	20	ca. 40%cpE	7,5	1:64
RAC-H	25	ca. 50%cpE	7,5	1:64
ENS-Kul- turkon- trolle	-	-	-	1:16
Aujeszký Hannover II	25	ca. 60%cpE	7,0	1:16
Vaccinia Ankara	25	ca. 60%cpE	7,0	1:16

Zur Vermeidung dieser für Rhinopneumonitis nicht spezifischen Nebenreaktionen in der KBR wurden analoge Versuche bei exakt gleicher Technik in BHK-Kulturen angesetzt. Der Ablauf der Versuche wich nur insofern von denen mit ENS-Kulturen ab, als der cytopathische Effekt des RAC-H-Virus langsamer fortschreitet und bis zum 3. Tag p. inf. noch unvollständig blieb.

Diese Ergebnisse sind in der Tabelle II zusammengefaßt.

In BHK-Kulturen wurde der beste Gehalt an KB-Antigen 48 Stunden p. inf. erreicht. Er scheint dann nicht mehr weiter anzusteigen. Auffallend war hier, daß die Zellkultur in diesem Stadium der Infektion noch wenig cpE und nur geringe Zellzerstörung zeigte. Der Hauptanteil des KB-Antigens dürfte also in den noch intakten Kulturzellen lokalisiert sein. Kreuzreaktionen zwischen dem BHK-Kontrollantigen und dem Immuns serum wurden nicht beobachtet. Auch zwischen dem Aujeszky-Antigen, das wie das RV zu den Herpesviren gehört, sowie dem Vaccinia-Antigen und dem Immuns erum traten keinerlei Reaktionen auf, ein Beweis für die Spezifität der KBR und die Reinheit der Antigene. Im Verhalten zum Komplement waren Antigene aus ENS- oder BHK-Kulturen völlig neutral und einheitlich. Die Antigene aus Hamsterlebern zeigten demgegenüber stets mehr oder weniger antikomplementäre Eigenschaften.

Zur Verwendung in der Rhinopneumonitis-Routinediagnostik empfiehlt sich somit das aus infizierten BHK-Kulturen herstellbare KB-Antigen. Dafür sind folgende Gründe maßgeblich:

1. BHK-Antigen kann im Labor in einfacher Weise hergestellt und vorrätig gehalten werden.
2. Das Antigen hat günstige komplementbindende Eigenschaften.
3. Bei Verwendung dieses Antigens werden unspezifische Reaktionen vermieden.

Punkt 3 ist auch insofern von Bedeutung, als in Deutschland die Impfung gegen den Stutenabort mit einer Lebendvakzine weit verbreitet ist, die auf der Basis eines in ENS-Kulturen

Tabelle II: Virus-Titer und KB-Titer von KB-Antigen aus
BHK-Kulturen gegen 4 KB-Serumeinheiten von
Meerschweinchen-Immunserum

Virusstämme	Antigenernte Stunden p.inf	Status der infizierten Kultur	Virustiter in $-\log_{10}/\text{ml}$ (KID ₅₀)	KB-Titer
RAC-H	10	o.B.	5,0	0
RAC-H	15	o.B.	5,5	1:4
RAC-H	20	ca. 5%cpE	6,5	1:8
RAC-H	25	ca. 10%cpE	6,5	1:16
RAC-H	48	ca. 25%cpE	6,5	1:64
RAC-H	72	ca. 40%cpE	6,25	1:32
BHK-Kultur- kontrolle	-	-	-	0
Aujeszy (Hannover II)	25	ca. 40%cpE	6,5	0
Vaccinia Ankara	25	ca. 50%cpE	7,25	0
RAC-H (Hamster)x	80	-	6,5	1:32

x = aus den Lebern infizierter Hamster hergestelltes KB-Antigen

attenuierten Virus hergestellt wird. Geimpfte Pferde bilden deshalb auch Antikörper gegen ENS-Zellkultur-Normalantigen, was eine diagnostische KBR (bei Verwendung von KB-Antigen aus infizierten ENS-Kulturen) unspezifisch beeinflusst.

2. Vergleich von KB-Antigen aus BHK-Kulturen mit KB-Antigen aus Lebern infizierter Goldhamster

Ein komplementbindendes BHK-Antigen, geerntet 48 Stunden p. inf. und mit einem Titer von 1:64, wurde vergleichend mit einem KB-Antigen aus infizierten Hamsterlebern (siehe Tabelle II) an 6 Pferde-Immunseren bekannten Titers geprüft, um die Eignung zur Serumtitration zu untermauern. Dabei wurden jeweils 4 KB-Einheiten des Antigens den Serumverdünnungen in 2er Potenzen zugesetzt. Normal-Antigen sowie negative Serumkontrollen liefen parallel. Die Ergebnisse sind in der Tabelle III wiedergegeben.

Bei 3 Seren lagen die Serumtiter auf gleicher Höhe, 3 Seren zeigten mit dem Kulturan antigen um jeweils eine Stufe höhere Titer. Damit war abgesichert, daß KB-Kulturan antigen dem Antigen aus Hamsterlebern mindestens ebenbürtig ist.

3. Serologische Untersuchungen über die Verbreitung von Rhinopneumonitis-Infektionen im Bezirk Oberbayern unter Verwendung von BHK-Kulturan antigen

Im Zeitraum der vorliegenden Untersuchungen war Gelegenheit, 96 Seren von Pferden, bei welchen der Verdacht einer Rhinopneumonitis-Virusinfektion vorlag, auf komplementbindende Antikörper zu untersuchen. 16 davon stammten von Vollblutpferden, 47 von Kaltblütern, während bei 33 die Herkunftsrasse nicht eindeutig bekannt war. Die KBR wurden mit 4 KB-Einheiten des BHK-Kulturan antigen durchgeführt (Tabelle IV). Bei allen untersuchten Tieren wurde eine vorausgegangene Impfung gegen den Stutenabort verneint.

Tabelle III: Vergleichende Titration von 6 Pferdeseren
mit Antigen aus Goldhamsterleber (4 KB-Einheiten)
und Antigen aus BHK-Kulturen (4 KB-Einheiten)

Pferde- serum Nr.	Serumtiter gegen KB-Antigen aus	
	BHK-21-Zellen	Goldhamsterleber
1	1:256	1:128
2	1:128	1:64
3	1:64	1:32
4	1:64	1:64
5	1:64	1:64
6	1:32	1:32

Tabelle IV: Serologische Untersuchungen über die Verbreitung der Rhinopneumonitis-Infektion des Pferdes mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion

	Zahl der Proben	Nega- tiv 1:4	Serum-Titer 1:								Gesamt- pos.	Positiv in %
			4	8	16	32	64	128	256			
Vollblut	16	3	1	2	5	2	2	0	1	13	81	
Kaltblut	47	13	1	10	8	12	2	1	0	34	72	
Nicht be- kannter Schlag	33	5	1	0	0	10	7	8	2	28	83	
Insgesamt	96	21	3	12	13	24	11	9	3	75	78	

Insgesamt reagierten 75 der 96 Seren in der KBR positiv, 21 hatten einen Titer von kleiner als 1:4 und sind als negativ zu beurteilen. Der höchste Wert lag bei 1:256, Titer von 1:32 (1:8 bis 1:128) waren am häufigsten anzutreffen. Diese Ergebnisse zeigen, daß antikörperpositive Tiere zwar keine hohen Serumtitere erreichen, aber antikörpernegative Seren keinen KB-Titer haben. Der aus den Proben resultierende Durchseuchungsgrad von ca. 80% stimmt gut überein mit den bisher gemachten Erfahrungen, wenn man dabei berücksichtigt, daß vornehmlich Seren bereits Rhinopneumonitis-verdächtiger Fälle zur Untersuchung kamen.

Schließlich bestätigte sich auch in diesen Serumuntersuchungen die Eignung des KB-Antigens aus BHK-Kulturen zur serologischen Diagnose der Rhinopneumonitis-Infektion.

4. Untersuchungen über die Bildung von komplementbindenden Antikörpern nach der Impfung von Mäusen und Goldhamstern mit attenuiertem RV

a) Untersuchungen an Mäusen

Drei Gruppen mit je 100 weißen Mäusen wurden subkutan am Rücken mit einem attenuierten RV-Impfstamm (420. Passage in ENS-Kulturen) geimpft. Jedes Tier der Gruppe I erhielt je 0,1 ml ($=10^{7,5} \text{KID}_{50}$), der Gruppe II je 0,3 ml ($=3 \times 10^{7,5} \text{KID}_{50}$) und der Gruppe III je 1 ml ($=10^{8,5} \text{KID}_{50}$) Kultur-virussuspension.

Die Impfungen wurden von den Tieren reaktionslos getragen. Nach 7, 10, 15, 21 und 28 Tagen p. inf. wurden von jeder Gruppe 20 Mäuse entblutet, das Blut jeder Gruppe gepoolt und die gewonnenen Sammelseren später in der KBR sowie im Neutralisationstest auf Rhinopneumonitis-Antikörper quantitativ untersucht.

Die Ergebnisse dieser Serumteste sind in Tabelle V zusammengefaßt und in der Abbildung I graphisch dargestellt.

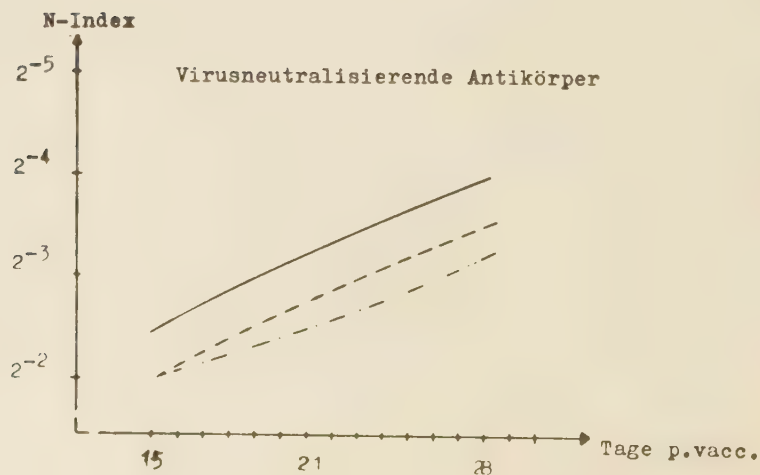
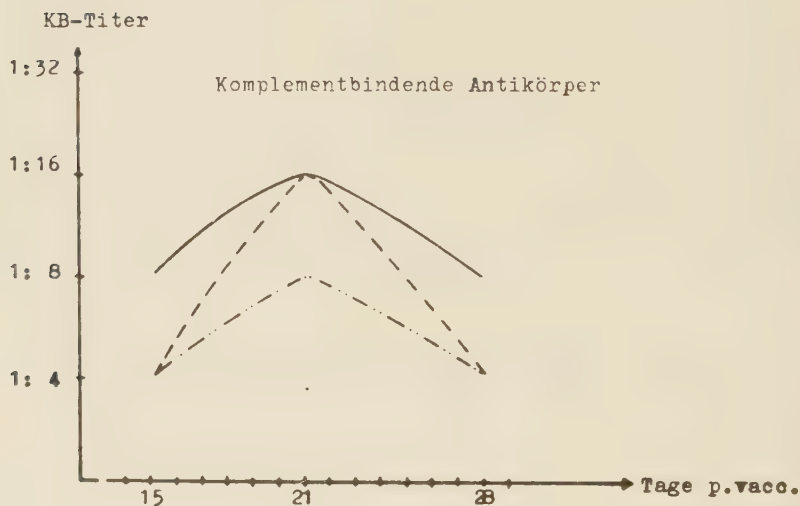
Tabelle V: Bildung komplementbindender und neutralisierender Antikörper bei Mäusen nach Impfung mit attenuiertem RV, Stamm RAC-H, 420. ENS-Passage

	I m p f d o s i s					
Tage p.inf.	0,1 ml s.c.		0,3 ml s.c.		1 ml s.c.	
	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index
7	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
15	1:4	$2^{-2,0}$	1:4	$2^{-2,0}$	1:8	$2^{-2,5}$
21	1:8	$2^{-2,5}$	1:16	$2^{-2,75}$	1:16	$2^{-3,25}$
28	1:4	$2^{-3,25}$	1:4	$2^{-3,50}$	1:8	$2^{-4,0}$

N-Index = Serum-Neutralisationsindex

KB-Titer= Serum-Komplementbindungstiter

Abbildung 1: Bildung von komplementbindenden und virusneutralisierenden Antikörpern bei Mäusen nach der Impfung mit attenuiertem RV, Stamm RAC-H
 --- 0,1ml s.c.; — 0,3ml s.c.; -.- 1ml s.c.



Bei allen Mäusegruppen waren die KB-Antikörper erstmals am 15. Tag p. vacc. nachweisbar und erreichten am 21. Tag ihren höchsten Titer. Auch die N-Antikörper erschienen erst am Ende der 2. Woche im Blut. Sie stiegen aber bis zum 28. Tag weiter an. Die Höhe der Titer an KB-Antikörpern differierte zwischen den Gruppen II und III nur unwesentlich. Bei den N-Antikörpern lag der N-Index jedoch jeweils etwas höher.

b) Untersuchungen an Goldhamstern

Drei Gruppen mit je 20 erwachsenen Goldhamstern wurden intraperitoneal mit dem attenuierten RV-Impfstoff (420. Passage in ENS-Kulturen) geimpft. Jedes Tier der Gruppe I erhielt 0,1 ml ($= 10^{7,5}$ KID₅₀), der Gruppe II 0,3 ml ($= 3 \times 10^{7,5}$ KID₅₀) und der Gruppe III 1 ml ($= 10^{8,5}$ KID₅₀) Kulturvirussuspension. Aus der Gruppe I starben in der ersten Woche p. vacc. 3, aus der Gruppe II 6 und aus der Gruppe III 7 Tiere. Die Ausfälle können als toxische Reaktionen gewertet werden, die durch die i.p.-Gabe der hochkonzentrierten Viruspräparate ausgelöst wurden.

Den Tieren der Gruppe I und II wurden am 7., 10., 15., 21. und 28. Tag p. vacc. per Herzpunktion kleine Blutproben entnommen und pro Entnahmetag und Gruppe Sammelseren gewonnen. Aus der Gruppe III, deren Tiere durch die Impfung offensichtlich am meisten gestresst waren und denen ebenfalls in Abständen wie oben Blutproben entnommen werden sollten, starben nach den Herzpunktionen vom 7. und 10. Tag weitere 10 Tiere. Die Blutentnahme des 15. und 21. Tages p. vacc. wurde daraufhin ausgelassen und die drei restlichen Goldhamster am 28. Tag entblutet.

Eine Gruppe IV mit 20 Goldhamstern wurde mit je 1ml Rhinopneumonitis-Impfvirus ($= 10^{8,5}$ KID₅₀) subkutan am Rücken appliziert, ohne daß die Impfreaktionen eintraten. Sammelseren wurden von dieser Gruppe, wie oben geschildert, in Abständen gewonnen.

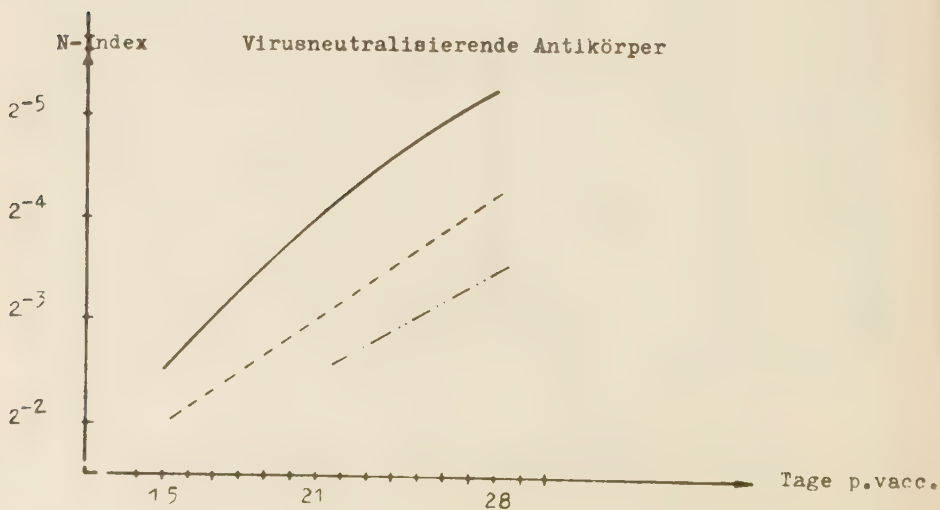
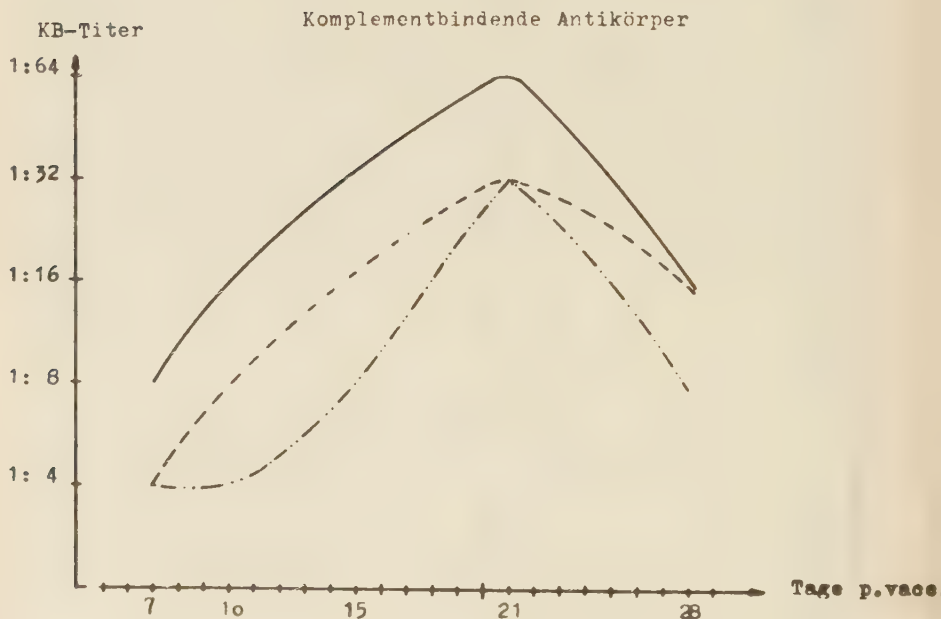
Die Serumproben der Gruppe IV wurden ebenfalls im KBR- und N-Test auf Antikörper untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle VI aufgeführt und in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

Die Goldhamster aller 4 Gruppen hatten bereits am 7. Tag p. vacc. Titer an KB-Antikörpern. Sie erreichten jeweils nach 3 Wochen ihren höchsten Wert und fielen z.T. rasch wieder ab. N-Antikörper waren bei Gruppe I und II nach 15 Tagen, bei der Gruppe IV (subkutan geimpft) erst nach 21 Tagen nachweisbar. Die höchsten Titer wurden stets erst nach 4 Wochen erreicht. Wie bei den Mäuseversuchen bildeten auch Hamster stets beide Arten von Serumantikörpern.

Tabelle VI: Bildung komplementbindender und neutralisierender Antikörper bei Goldhamster nach Impfung mit attenuiertem Rhinopneumonitisvirus, Stamm RAC-H, 420. ENS-Passage

Tage p. inf.	I m p f d o s i s				1 ml s.c.
	0,1 ml i.p.	0,3 ml i.p.	1 ml i.p.	1 ml i.p.	
7	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer
	1:4	0	1:8	0	1:4
10	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer
	1:8	0	1:16	0	1:4
15	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer
	1:16	2 ^{-2,0}	1:32	2 ^{-2,5}	1:8
21	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer
	1:32	2 ^{-3,0}	1:64	2 ^{-4,0}	1:32
28	KB-Titer	N-Index	KB-Titer	N-Index	KB-Titer
	1:16	2 ^{-4,25}	1:16	2 ^{-5,0}	1:8

Abbildung 2: Bildung von komplementbindenden und virusneutralisierenden Antikörpern bei Goldhamstern nach der Impfung mit attenuiertem RV, Stamm RAC-H
 --- 0,1 ml i.p.; — 0,3 ml i.p.; -·-·- 1 ml i.p.



D. B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Die serologische Diagnose des Stutenabortes (Rhinopneumonitis der Pferde) kann über die Erfassung der neutralisierenden oder auch der komplementbindenden Antikörper gestellt werden. Die Komplementbindungsdiagnose hat dabei den Vorteil, daß sie einfacher und ganz bedeutend rascher durchführbar ist. Besonders bei Bestandsuntersuchungen oder etwa Erhebungen über den Verseuchungsgrad größerer Gebiete ist dies ein entscheidender Vorteil. Wie von GOIS und SKODA (1962) bereits aufgezeigt wurde, kann das Vorliegen von KB-Antikörpern früher eine Infektion aufdecken, da diese Antikörper in der Regel früher gebildet werden, und mehr Hinweise über den Status einer Infektion geben, als die virusneutralisierenden Antikörper. Auch bei der Erfassung eines Impfschutzes nach Vakzinierung mit Rhinopneumonitis-Lebendimpfstoff kann der Nachweis komplementbindender Antikörper wertvolle Hilfe leisten.

Komplementbindende Rhinopneumonitis-Antigene wurden bisher aus den Lebern oder Lungen infizierter Goldhamster gewonnen. Solche Antigene haben jedoch bezüglich komplementärer Eigenschaften, Reinheit und Haltbarkeit Nachteile. Man suchte deshalb nach einem Weg, aus infizierten Zellkulturen diagnostisches KB-Antigen herzustellen. In den vorliegenden Versuchen konnte dies realisiert werden. Die besten Kulturvirus-Antigene lieferten mit hohen Virusdosen infizierte Zellkulturen, aus denen in der Anfangsphase des cytopathogenen Effektes (ca. 48 Stunden p. inf.) der Zellrasen mit wenig Kulturmedium aufgenommen und aufgeschlossen wird. Antigene aus BHK-21-Kulturen sind dabei solchen aus Schweinenierenkulturen überlegen, da mit ihnen keine zellspezifischen Kreuzreaktionen auftreten, wenn Pferde mit attenuiertem Schweinenieren-Kulturvirus vakziniert wurden und solche Seren untersucht werden.

Im Vergleich mit Hamsterleberantigen lieferten die Kulturantigene in der Prüfung gegen 6 Immunseren bekannten Titer zum Teil bessere Ergebnisse.

Die Brauchbarkeit der KB-Kulturantigene in der Routine-diagnose wurde durch serologische Untersuchungen an Pferden verschiedener Herkunft geprüft. Dabei wurden einwandfreie und exakt reproduzierbare Ergebnisse erhalten. Aus dem Bezirk Oberbayern von verschiedenen Beständen eingesandte Pferdeseren hatten zu annähernd 80% signifikante KB-Antikörpertiter. Selbst wenn man berücksichtigt, daß nur Proben von Verdachtsfällen zur Einsendung kamen, ergibt sich aus diesen Befunden ein relativ hoher Verseuchungsgrad, denn die KB-Antikörper weisen auf ein zeitlich wenig zurückliegendes Seuchengeschehen hin.

Anhand von Untersuchungen mit der Komplementbindungsreaktion und dem Serumneutralisationstest wurde auch versucht, die Bildung von entsprechenden Antikörpern nach der Impfung von weißen Mäusen und erwachsenen Goldhamstern mit einem attenuierten Rhinopneumonitis-Impfstamm zu verfolgen. Diese Versuche sollten zeigen, ob kleine Versuchstiere für ein Verfahren der Wirksamkeitsprüfung von Rhinopneumonitis-Lebendimpfstoffen geeignet wären, das auf einen Vergleich der Antikörperentwicklung aufbaut. Untersuchungen dieser Art lagen bisher nicht vor.

Die weißen Mäuse bilden komplementbindende und virusneutralisierende Antikörper in etwa gleicher Zeitfolge aus. Nur die neutralisierenden Antikörper erreichten jedoch Werte, die die Möglichkeit ihrer Auswertung für einen vergleichenden Wirksamkeitstest offen lassen.

Goldhamster entwickeln nach i.p. und s.c. Impfung ebenfalls beide Antikörperarten. Die KB-Antikörper werden hier jedoch 1 Woche früher erfaßt, als die neutralisierenden. Da für eine Wirksamkeitsprüfung nur die s.c.-Applikation des Impfstoffes

in Frage kommt, können lediglich die Ergebnisse dieses Versuches bezüglich einer geeigneten Testmethode diskutiert werden.

Der Goldhamster scheint hierfür besser geeignet als die Maus, da höhere KB-Titer erzielt werden und die zeitlich unterschiedliche Bildung der beiden Antikörperarten weitere Qualifizierungsmöglichkeiten eröffnet.

E. Zusammenfassung

1. Die Zellkultur eignet sich zur Herstellung komplementbindender Antigene, die für die serologische Diagnose des Stutenabortes eingesetzt werden kann. Eine geeignete Technik der Antigenherstellung wurde erarbeitet.
2. Komplementbindende Antigene aus infizierten BHK-21-Kulturen sind vorteilhafter als solche aus Schweinenierenkulturen, da sie mit Antikörpern, die von Lebendimpfstoffen mit attenuiertem Schweinenieren-Kulturvirus herführen, keine unspezifischen Kreuzreaktionen ergeben.
3. Die Kulturantigene sind den herkömmlichen Antigenen aus Hamsterorganen in der komplementbindenden Kraft gleichwertig und hinsichtlich ihrer praktischen Eigenschaften überlegen.
4. Im Bezirk Oberbayern ergab sich aus Stichprobenuntersuchungen auf Rhinopneumonitis-Antikörper ein relativ hoher Verseuchungsgrad bei Pferden.
5. Komplementbindende und virusneutralisierende Antikörper wurden nach einer Impfung mit attenuiertem Rhinopneumonitisvirus auch von der weißen Maus und vom Goldhamster gebildet. Die Möglichkeit, diese Antikörperbildung in einem Wirksamkeitstest für Rhinopneumonitis-Lebendimpfstoffe am kleinen Versuchstier zu verwerten, wird diskutiert.

S u m m a r y

Studies on the qualification of cell culture antigen from equine rhinopneumonitis virus for the complement fixation test and the formation of antibodies in mice and hamsters after vaccination with attenuated rhinopneumonitis virus.

1. Tissue cultures can be used for the production of complement fixation antigens of rhinopneumonitis virus. Technical procedures for the preparation of the antigens were described.
2. Complement fixation antigens from BHK cell cultures are more suitable than antigens from pig kidney cultures. They do not give unspecific reactions with sera from horses treated with vaccines with pig kidney cells origin.
3. Cell culture antigens are equal in their antigenic quality and have better technical properties than the traditional antigens from organs of hamsters.
4. Investigations on the distribution of rhinopneumonitis infection in horses in Oberbayern with complement fixation test showed a high percentage of positive sera.
5. Possibilities were discussed to develop a potency test for live rhinopneumonitis vaccines basing on the antibody formation in mice and hamsters.

F. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. Bartha, A., und
D. Feher,
1954: Adatok a kaucák virusokozta elvetélésék ismeretéhez.
Magyar Alltóry, Lapja 9, 400.
2. Berthelon, M., et
R. Gaumont,
1963: Virus grippal, avortments et déviation du complément, chez la jument.
Rev. Méd. Vét. 114, 412.
3. Boer, G. F., de
1966: Distribution of neutralizing antibodies against equine rhinopneumonitis virus in Dutch horse sera as measured by assay method with fluid overlay.
Arch. Virusforsch. 19, 23.
4. Brion, A.,
M. P. Fontaine, et
R. Moraillon,
1968: Enquete epidemiologique sur la rhinopneumonie equine en France par la technique de la fixation du complément.
Rec. Méd. Vét. 144, 197.
5. Brion, A.,
M. Fontaine,
A. Moraillon,
M. Fontaine, and
R. Moraillon,
1968: Le Diagnostic Expérimental de la forme abortive de la Rhinopneumonie du cheval.
Recherches Vétérinaires 1, 63.
6. Burrow, R.,
1966: Rhinopneumonitis virus neutralizing antibodies levels in British thorough bredmares.
International Conf. on Equine Infectious Diseases, Stresa

7. Carmichael, L.E., and
F.D. Barnes, 1964: The relationship of infectious rhino-
tracheitis to equine rhinopneumonitis.
Proc. 65th Am. Meet. U.S. Sanitary
Livestock Ass. p. 384.
8. Crandell, R.A., 1967: The herpes virus group
Am. J. Vet. Res. 28, 577.
9. Doll, E.R., 1961: Immunisation against viral rhinopneu-
monitis of horses with live virus
propagated in hamsters.
J. Am. Vet. Med. Ass. 139, 1324.
10. Doll, E.R., and
T.J. Bryans, 1962: Development of complement-fixing and
virus-neutralizing antibodies in
viral rhinopneumonitis of horses.
Am. J. Vet. Res. 23, 843.
11. Doll, E.R., and
T.J. Bryans, 1963a: Immunisation of young horses against
viral rhinopneumonitis.
Cornell Vet. 53, 24.
12. Doll, E.R., and
T.J. Bryans, 1963b: Epizootiology of viral rhinopneumo-
nitis.
J. Am. Vet. Med. Ass. 142, 31.
13. Doll, E.R.,
Crowe, M.E.,
T.J. Bryans, and
W.H. McCollum, 1955: Infection immunity in equine virus
abortion.
Cornell Vet. 45, 387.
14. Doll, E.R.,
W.H. McCollum, and
T.J. Bryans, 1959b: A procedure for evaluating the anti-
genicity of killed virus vaccines for
equine rhinopneumonitis.
Cornell Vet. 49, 212.

15. Doll, E.R.,
W.H. McCollum,
T.J. Bryans, and
M.E. Crowe,
1959a: In vitro serum neutralisation of
hamster-propagated equine rhino-
pneumonitis virus.
Cornell Vet. 49, 28.
16. Doll, E.R.,
W.H. McCollum,
M.E. Wallace,
T.J. Bryans, and
M.G. Richards,
1953a: Complement fixation reaction in
equine virus abortion.
Am. J. Vet. Res. 14, 40.
17. Doll, E.R.,
M.G. Richards, and
M.E. Wallace,
1953b: Adaption of the equine abortion
virus to suckling hamsters.
Cornell Vet. 43, 551.
18. Doll, E.R., and
M.E. Wallace,
1954: Cultivation of equine abortion and
equine influenza viruses on the
chorioallantoic membrane of chicken
embryo.
Cornell Vet. 44, 453.
19. Gois, M. und
R. Skoda,
1962 : Vysetrowanie koniv CSSR na virusova
rhinopneumonitidu komplementfixa-
cnyrna ne ultralizacnym testom.
Vet. Cas. 11, 263.
20. Gold, E.R.,
W.J. Löckyer, and
G.H. Tovey,
1958 : Use of lyophilized formoltreated
red cells in blood group serology.
Nature 18, 951.
21. Hoggan, M.D.,
J.F. Metzger, and
C.W. Smith,
1961 : Immunofluorescent and histochemical
studies of equine abortion virus
hepatitis in hamsters.
Federation Proc. 20, 426.

22. Ishizaki, R., and
T. Shimizu,
1964: Sequential development of antigens of equine rhinopneumonitis virus in infected hamster liver cells as studied with fluorescent antibodies.
Nat. Inst. Animal Hlth. Quart. 4, 194.
23. Ishizaki, R.,
T. Shimizu, and
M. Matumoto,
1963: Sequential development of antigens of equine rhinopneumonitis virus in cultured horse kidney cells as studied with fluorescent antibodies.
Arch. Virusforsch. 12, 361.
24. Jones, T. C.,
C. A. Gleiser,
F. D. Maurer,
M. W. Hall, and
T. O. Roby,
1948: Transmission and immunization studies on equine influenza.
Am. J. Vet. Res. 9, 243.
25. Kaerber, G.,
1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmk. 162, 480.
26. Kaji, T.,
1963: Epizootiological investigation of equine rhinopneumonitis by complement-fixation test.
I. Pattern of antibody response in individual horses and antibody distribution in enzootic areas.
Nat. Inst. Animal Hlth. Quart. 3, 11.
27. Kawakami, Y.,
T. Kaji,
R. Ishizaki,
T. Shimizu, and
M. Matumoto,
1962: Etiologic study on an outbreak of acute respiratory disease among colts due to equine rhinopneumonitis virus.
Jap. J. Exp. Med. 32, 211.

28. Kolmer, J.A., and
F.Boerner,
1941: Approved Laboratory Technic
Appleton-Century Co.
Int.Third Edition, P.616
Zit.nach Petzoldt u.Mitarb., 1966.
29. Kress, F.,
1941: Virusabort bei der Stute.
Wien.Tierärztl.Mschr. 28, 725.
30. Kubin, G., und
O.Kölbl,
1966: Isolierung des Rhinopneumonitisvirus
aus abortierten Pferdefeten in
Österreich.
Wien.Tierärztl.Mschr. 53, 275.
31. Kubin, G., und
O.Kölbl,
1969: Immunisierung von Pferden gegen die
Rhinopneumonitis (Stutenabort) mit
einem an Ferkelhodenzellen adaptierten
Lebendvirus.
Wien.Tierärztl.Mschr. 56, 275.
32. Lindemann, L.,
K.Petzoldt, und
M.Merk,
1967: Die Bedeutung komplementbindender
Antikörper bei der natürlichen Rhino-
pneumonitis-Infektion von tragenden
Stuten.
Berliner-Münchener Tierärztl.
Wschr. 80, 425.
33. Manninger, R., und
J.Mócsy,
1959: In Huttyra-Marek: Spezielle Pathologie
und Therapie der Haustiere.
II.Auflage, VEB Gust.Fischer Verlag Jena
34. Mayr, A.,
1970: Schutzimpfung der Pferde gegen Virus-
abort.
Tierärztl.Umschau, 25, 111.
35. Mayr, A.,
H.O.Böhm,
J.Brill, und
S.Woyciechowska,
1965: Charakterisierung eines Stutenabortvirus
aus Polen und Vergleich mit bekannten
Rhinopneumonitis-Virusstämmen des
Pferdes.
Arch.Virusforsch. 17, 216.

36. Mayr, A.,
J. Pette,
K. Petzoldt, und
K. Wagener,
1968: Untersuchungen zur Entwicklung eines
Lebendimpfstoffes gegen Rhinopneumo-
nitis der Stuten (Stutenabort).
Zbl. Vet. Med., B 15, 406.
37. Paulsen, J.,
1966: Über das Vorkommen von komplement-
bindenden Antikörpern gegen das
Rhinopneumonitisvirus im Blutserum
von Stuten und Hengsten in Hessen.
Med. Vet. Dissertation, Giessen, 1966.
38. Petzoldt, K.,
1967: Die Technik der Komplementbindungs-
reaktion zur Diagnose des Virusab-
ortes der Stuten.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 74, 252.
39. Petzoldt, K.,
L. Lindemann, und
M. Merk,
1966: Serologische Untersuchungen zum
Nachweis von Antikörpern des Rhino-
pneumonitis.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 73, 536.
40. Plummer, G.,
1964: Serological comparison of herpes
viruses.
Brit. J. Exper. Path. 45, 135.
41. Plummer, G., and
A. P. Waterson,
1963: Equine herpes virus.
Virology, 19, 412.
42. Randall, C. G.,
D. L. McVickar, and
E. R. Doll,
1950: A complement-fixation-test for
equine virus abortion.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 75, 465.
43. Reed, L. J., and
H. Muench,
1938: A simple method of estimating 50%
endpoints.
Am. J. Hyg. 27, 493.

44. Rolle, M., und
A. Mayr, 1966: Lehrbuch der Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Haustiere, 6. Auflage
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
45. Schwöbel, W., und
E. Traub, 1959: Erfahrungen bei der Züchtung von Maul- und Klauenseuchevirus in Schweinenierenzellen unter besonderer Berücksichtigung der Gefrierfähigkeit des Kulturvirus.
Mhft. Tierheilkd. 11, 13.
46. Semerdjiev, B., 1962: Hämagglutination mit dem Virus des Stutenabortes.
Zbl. Bakt. I. Orig. 185, 316.
47. Semerdjiev, B., und
S. Christov, 1958: Komplementbindungsreaktion zur Diagnose des Virusabortes der Stuten.
Arch. exper. Vet. Med. 12, 807.
48. Shimizu, T.,
Ishizaki, R. and
M. Matumoto, 1962: Two distinct antigens, viral and soluble of equine rhinopneumonitis virus as revealed by complement-fixation test.
Nat. Inst. Animal Health 2, 117.
49. Shimizu, T.,
R. Ishizaki, and
M. Matumoto, 1963: Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in Japan.
Jap. J. Exper. Med. 33, 133.
50. Shimizu, T.,
R. Ishizaki,
S. Ishii,
Y. Kawakami,
T. Kaji,
K. Sugimura, and
M. Matumoto, 1959: Isolation of equine abortion virus from natural cases of abortion in horse kidney cell cultures.
Jap. J. Exper. Med. 29, 643.

51. Shimizu, T.,
Y. Kawakami,
T. Kaji,
R. Ishizaki, and
M. Matumoto, 1961: Experimental infection of colts with
equine rhinopneumonitis.
Nat. Inst. Animal Health Quart. 1, 119.
52. Teubner, F., 1966: Vergleichende serologische Unter-
suchungen über die Herpesviren der
Tiere.
Vet. Med. Dissertation, München, 1966.
53. Topolnik, E.,
Z. Alerasj, und
S. Audi, 1955: Die Komplementbindung bei dem Virus-
abort der Stuten.
Vet. Arch. Zagreb 25, 188.
54. Weiland, E., und
J. Dimitriadis, 1970: Fluoreszenzserologische Diagnostik
von Rhinopneumonitis-Virus-Infektionen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 83, 95.
55. Wittmann, G., 1958: Virusspezifische Präzipitationen bei
der ansteckenden Schweinelähme mit
Hilfe des Agar-Diffusionsverfahrens.
Zbl. Vet. Med. 5, 505.

Zum Schluß danke ich Herrn Prof. Dr. A. Mayr für die freundliche Überlassung des Themas und für das entgegengebrachte Verständnis sowie seine Unterstützung herzlichst.

Mein spezieller Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. H. Mahnel, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

LEBENS LAUF

Am 3. Februar 1939 wurde ich, Aloysius Mubiru als Sohn von Damian Mubiazalwa und seiner Ehefrau Sseforosa in Villa Maria, Uganda geboren.

Die Grundausbildung erhielt ich in St. John's Junior Secondary, Kabuwoko. Von 1957 - 1958 besuchte ich das St. Henry's College, Kitovu. 1959 erwarb ich im St. Mary's College, Kisubi das Cambridge School Certificate O - Level und zwei Jahre später das Cambridge Higher School Certificate.

1962 ging ich in die Schweiz und nach Erlernung der deutschen Sprache begann ich im Wintersemester 1963/64 mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität Zürich, wo ich das Vorphysikum und Physikum bestand.

Im Wintersemester 1966/67 setzte ich das Studium an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München fort und beendete es mit Abschluß der Tierärztlichen Prüfung im Wintersemester 1968/69.

Zur Zeit besuche ich den Diplomkurs in tropischer Veterinärmedizin an der Universität Edinburgh, Schottland.

